

灯盏花素对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用

卢金萍 姜 黎

(武汉大学中南医院综合医疗科, 湖北省武汉市武昌区东湖路 169 号, 430071)

[摘要] **目的** 探讨灯盏花素对家兔心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的保护作用。**方法** 将19只家兔随机分为假手术组(6只)、模型组(7只)、治疗组(6只)。以穿线结扎左冠状动脉前降支制备大鼠心肌缺血/灌注模型,治疗组于结扎前5min于耳缘静脉注射灯盏花素,观察各组心肌超微结构,右室血清乳酸(LA)、游离脂肪酸(NEFA)和心肌组织中LA、NEFA、三磷酸腺苷(ATP)水平的变化。**结果** 与假手术组比较,模型组血清及心肌组织中LA、NEFA水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),心肌组织中ATP含量显著降低($P < 0.01$),心肌超微结构损害明显;与模型组比较,治疗组血清及心肌组织中LA、NEFA水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),心肌组织中ATP含量显著增高($P < 0.01$),心肌超微结构损害减轻。**结论** 灯盏花素可通过改善心肌能量代谢障碍和保护线粒体结构对MIRI起到保护作用。

[关键词] 心肌再灌注损伤;灯盏花素;能量代谢;心肌超微结构

Protective Effect of Breviscapine on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rabbits

LU Jinping, JIANG Li

(Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071)

ABSTRACT **Objective** To explore the protective effect of Breviscapine on myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) in rabbits and its mechanism. **Methods** Nineteen rabbits were randomized into three groups: sham operated group ($n = 6$), ischemia/reperfusion model group ($n = 7$), and Breviscapine treatment group ($n = 6$). The ischemia/reperfusion models were prepared with the thread-ligation of left anterior descending coronary artery. Five minutes before the ligation, the treatment group was treated with the ear intravenous injection of Breviscapine. The myocardial ultrastructure of rabbits; changes of serum lactic acid (LA) and non-esterified fatty acid (NEFA) of the ventriculus dexter, and the LA, NEFA and adenosine triphosphate (ATP) in the myocardial tissues were detected. **Results** Compared with the sham operated group, the content of LA and NEFA in the serum and myocardial tissues in the model group was significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), the content of ATP in the myocardial tissues was significantly decreased ($P < 0.01$), and the myocardial ultrastructure was significantly injured. Compared with model group, the content of LA and NEFA in the myocardial tissues in the treatment group was significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), the content of ATP in the myocardial tissues was significantly increased ($P < 0.01$), and the injury of myocardial ultrastructure was significantly relieved. **Conclusion** Breviscapine is effective in the protection of myocardial tissues injured by ischemia and reperfusion through improving the cardiac energy metabolism and protecting the structure of mitochondria. **Key Words** Myocardial reperfusion injury; Breviscapine; Energy metabolism; Myocardial ultrastructure

灯盏花素具有活血化瘀,抑制血小板和红细胞黏附和聚集,降低血黏度,扩张冠状动脉,增加心肌供氧量等作用^[1],临床应用于治疗冠心病心绞痛及辅助治疗急性心肌梗死^[2],而能量代谢障碍是心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的始发环节^[3]。因此,我们利用家兔缺血/灌注(I/R)模型来模拟心肌梗死后的再通过程,并给予灯盏花素进行干预,初步探讨其对I/R模型能量代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

健康日本大耳白家兔 19 只,体重 2~2.5kg,购于武汉大学实验动物中心(实验动物质量合格证号为 0037213)。

1.2 药物与试剂

注射用灯盏花素由湖南省湘衡制药厂生产,规格 10mg/支,批准文号:湘卫药准字(1994)第 024049 号。血清乳酸(LA)及游离脂肪酸(NEFA)试剂盒购自南京建成生物公司。

1.3 模型制备

I/R 模型参照 Simpson 法^[4]进行。以心电图测心率,结扎成功的标志为 I、aVL 导联出现 ST 段弓背上抬,缺血区心外膜心电图 ST 段抬高, T 波高耸或 ST 段压低, T 波深倒置。

1.4 动物分组与给药

将 19 只兔按随机数字表分为 3 组,①假手术组(6 只),开胸后冠状动脉前降支(LAD)只穿线不结扎,旷置 20min,再观察 6h;②模型组(7 只),结扎 LAD 20min,松扎后观察 6h,其中 1 只死于再灌注早期室颤。

③治疗组(6只),结扎LAD 20min,于结扎前5min于耳缘静脉缓慢持续注射灯盏花素(5mg/kg),直至松扎后6h;其他2组均由耳缘静脉以静脉输液泵恒速(每小时10ml/kg)输入等量生理盐水。

1.5 测定指标和方法

1.5.1 LA、NEFA 检测 实验终止时由右心室抽血2ml,取上清;另取缺血区中央部位心肌组织约200mg,加生理盐水制成2%的匀浆,取上清液,按试剂盒说明书测定两种样本的LA、NEFA。

1.5.2 心肌组织三磷酸腺苷(ATP)含量测定 实验终止时取心尖部心肌组织50~80mg,迅速置于液氮中制成冰冻薄片,称重后以3.6%高氯酸(每毫克组织加高氯酸20μl)制成匀浆。低温离心5min,取上清液,再低温离心5min,取上清液15μl,采用免疫发光法检测。

1.5.3 心肌组织超微结构观察 实验终止时取左室缺血区中央部位小块心肌组织(假手术组取相应部位心肌),置于2.5%戊二醛中固定,常规脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,在投射电镜下观察心肌组织超微结构。

1.6 统计学方法

采用SPSS 13.0 统计分析软件处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组家兔心肌超微结构比较

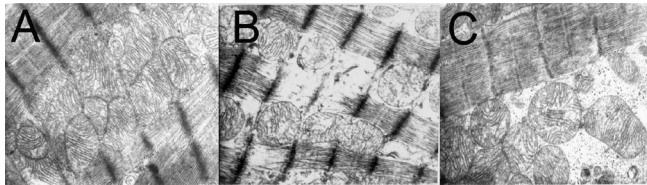


图1 各组家兔心肌电镜图(20 000×)

图1-A示,假手术组心肌纤维排列连续规则,Z线明显,H带可辨,闰盘处肌丝结构完整。线粒体嵴排列整齐,间隙明显。并可见较丰富糖原颗粒。图1-B示,模型组肌丝结构不完整,部分肌丝断裂。线粒体排列紊乱,部分线粒体肿胀,脊紊乱、稀疏,呈细颗粒状,无明显糖原颗粒可见。图1-C示,治疗组肌丝结构完整、连续。线粒体嵴排列整齐,肿胀及空泡明显减轻,并可见较多糖原颗粒。由此可见,与模型组比较,经灯盏花素

治疗后,治疗组家兔心肌肌丝结构完整,线粒体肿胀较轻,外膜完整,嵴排列较紧密,形态学改变明显减轻,糖原颗粒亦明显可见。

2.2 血清及心肌组织LA和NEFA含量及心肌组织ATP含量比较

表1示,再灌注6h时,与假手术组比较,模型组血清及心肌组织LA和NEFA含量明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),心肌组织ATP含量明显减低($P < 0.01$)。提示心肌缺血再灌注过程中存在心肌能量代谢障碍。与模型组比较,治疗组血清及心肌组织LA和NEFA含量明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),心肌组织ATP含量明显增高($P < 0.01$)。

3 讨论

MIRI是心肌梗死患者溶栓及冠状动脉造影介入术再通治疗中常见的病理生理现象,主要表现为梗死区血液灌流重建后反而发生心肌钝抑、心肌细胞坏死加速、心律失常、甚至猝死等病情恶化的表现。氧自由基损伤、钙超载和能量代谢障碍被认为是MIRI的主要原因。而心肌能量代谢障碍是MIRI的始发环节。

心肌缺血发生的早期,由于缺血组织内氧合血红蛋白被消耗,能量代谢从线粒体的有氧氧化转变为以糖酵解为主,糖酵解产生的ATP成为维持心肌细胞存活是唯一能量来源^[3]。因此,在再灌注后相当一段时间内心肌细胞仍靠糖酵解提供能量。另外,当心肌细胞再灌注获得氧时,脂肪酸β氧化增强^[5],ATP产生增多,但同时耗氧也增加。这不利于再灌注早期心肌功能的恢复。同时,过度活跃的脂肪酸β氧化也抑制了葡萄糖氧化磷酸化,更加重心肌细胞损伤。因此,缺血和再灌注时葡萄糖氧化和脂肪酸氧化相对不平衡可能是MIRI的重要因素^[6]。

本实验结果显示,I/R模型组心肌超微结构的病理改变显著,主要表现为线粒体的损伤和心肌纤维的变化,尤其线粒体的损伤较为明显;血清及心肌组织中LA及NEFA含量明显高于假手术组,而心肌组织中ATP含量显著降低。说明MIRI存在能量代谢障碍及线粒体损伤。而经灯盏花素治疗后,心肌超微结构损害明显减轻,线粒体嵴排列整齐,并可见较丰富糖原颗粒,血清及心肌组织中LA及NEFA含量明显降低,心

表1 3组兔LA、NEFA及ATP的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	血清		心肌组织		
		LA(mol/L)	NEFA(μmol/L)	LA(mmol/gprot)	NEFA(μmol/gprot)	ATP含量(μmol/g)
假手术组	6	8.30±3.82	61.15±25.92	3.25±1.76	114.34±36.51	0.41±0.10
模型组	6	12.68±4.85**	127.43±76.23**	4.23±1.71**	189.32±84.22*	0.12±0.09**
治疗组	6	9.19±2.96▲▲	72.41±35.33▲▲	3.47±1.28▲▲	124.46±30.87▲	0.39±0.11▲▲

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

(下转第1037页)

临床流行病学专家赖世隆教授指出:完善的中医临床疗效评价指标体系可从以下几方面进行构建:①对于“病”的公认的常规疗效评价指标;②构成证候特征变化的评价指标;③生命质量的评价指标,包括通用的生命质量评定量表、体现中医学特点的通用生命质量量表、疾病特异性的生命质量量表^[11]。因此,RA 中医疗效评价系统的构建,应该是既遵循中医理论,突出中医特色,又符合现代医学重证据、重标准的要求,宏观和微观相结合,整体和局部相结合,身心状态和生存质量相结合,更好地共同表达和反映中医药干预措施对RA 疾病个体特定病证的临床状态、自然进程、疾病结局或预后的干预影响。

国际药物经济与疗效研究协会提出,临床疗效评估应包括4个方面的内容:临床(医务)人员报告资料、生理报告资料(实验室指标)、照顾者报告资料、患者报告资料或患者的自我感受(patient-reported outcome, PRO)。这4个方面评价的要素具有交叉性、相对独立性、时空性和多维性。采用不同指标在不同时点应用的敏感性分析,凸现中医药干预RA 的疗效反应点,初步形成RA 中医临床疗效评价指标体系框架,综合信息,建立较完善的RA 中医临床疗效评价方法、指标体系和评价标准,利于推广应用。这是一项复杂的系统工程,是一个多层次、多领域、多指标、多维度的综合评价体系,是一个动态的不断修改和完善的过程。

参考文献

[1]刘风云,刘喜德,陈滢.中医药诊治类风湿关节炎的临床及实验研究进展[J].中华中医药学刊,2008,26(8):201-205.
[2]Giannini EH, Lovell DJ, Hepburn B. FDA draft guidelines

for the clinical evaluation of anti-inflammatory and antirheumatic drugs in children. Executive summary [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(5):715-718.
[3] Paulus HE, Egger MJ, Ward JR, et al. Analysis of improvement in individual rheumatoid arthritis patients treated with disease-modifying antirheumatic drugs, based on findings in patients treated with placebo [J]. Arthritis Rheum, 1990, 33(4):477-484.
[4] Felson DT, Anderson JJ, Boers M, et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(6):727-735.
[5] Levin JS, Glass TA, Kushi LH, et al. Quantitative methods in research on complementary and alternative medicine. A methodological manifesto. NIH Office of Alternative Medicine [J]. Med Care, 1997, 35(11):1079-1094.
[6] 申春梯,陈启光,张华强,等.建立病证结合疗效评价体系的思路和方法[J].中国中医基础医学杂志,2006,12(10):749-751.
[7] Sangha O. Epidemiology of rheumatic diseases [J]. Rheumatology, 2000, 39(Suppl 2):3-12.
[8] 徐丽玲,詹思延,李俊.生存质量评价在类风湿关节炎及其疗效评价中的应用[J].中华风湿病学杂志,2004,8(10):633-635.
[9] 方积乾,万崇华,郝元涛.与健康有关的生存质量的研究概况[J].中国康复医学杂志,2000,15(1):40-43.
[10] 刘建平.循证中医药临床研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2006:194-198.
[11] 赖世隆.中医药临床疗效评价若干关键环节的思考[J].广州中医药大学学报,2002,19(4):245-250.

(收稿日期:2009-12-29;修回日期:2010-03-29)
[编辑:黄健]

(上接第1032页)

肌组织中ATP含量显著增高。说明灯盏花素能有效保护心肌细胞线粒体,改善I/R模型心肌能量代谢障碍,提高心肌组织能源储备,防止心肌进一步损伤,从而保护心肌细胞。本研究发现,灯盏花素对缺血再灌注心肌超微结构及能量代谢障碍有明显的改善作用,其心肌能量代谢的细胞水平和分子水平的作用机制尚需进一步研究。

参考文献

[1]章小兵,彭代银,朱满芳,等.灯盏花素滴丸对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].安徽中医学院学报,2003,22(1):45-46.
[2]史俊玲,张小民,孙文彩.灯盏花辅助治疗急性心肌梗死的疗效观察[J].中国中西医结合杂志,2002,22(3):227-228.
[3] Lopaschuk G. Regulation of carbohydrate metabolism in ischemia and reperfusion [J]. Am Heart J, 2000, 139(2 Pt

3):S115-119.
[4] Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, et al. Identification of a time window for therapy to reduce experiment canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion [J]. Circ Res, 1988, 63(6):1070-1079.
[5] Garcia-Gonzalez MJ, Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, et al. New pharmacologic options in the treatment of acute coronary syndromes and myocardial ischemia-reperfusion injury: potential role of levosimendan [J]. Minerva Cardioangiol, 2007, 55(5):625-635.
[6] Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity [J]. Circ Res, 2007, 101(4):335-347.

(收稿日期:2010-04-07;修回日期:2010-05-06)
[编辑:行之]